

## *Abstract*

---

### **Abstract**

Lipid droplets (LDs) are intracellular organelles that store neutral lipids like triacylglycerols (TAG) and sterol esters inside a phospholipid monolayer. LDs arise from the endoplasmic reticulum (ER), and upon maturation can remain either connected with the ER or emerge in the cytoplasm. LDs respond to metabolic challenges by accumulating or mobilizing neutral lipids. How this process is regulated is poorly understood. In mammalian cells, the ER tubules coalign with microtubules (MTs) and both the ER and LD dynamics are dependent on MTs. MT dynamics can be controlled by severing enzymes that cut at any position along MT length. We have previously demonstrated that one isoform of the MT-severing protein spastin can redistribute from the ER to LDs. The N-terminal region of spastin was responsible for the targeting to LDs. However, the mechanistic insights for this targeting and the role of spastin in LD biology remained elusive. To this end, I generated spastin knock-out (KO) immortalized motor neuron-like cells. I found that spastin KO cells, in particular upon starvation, contained more PLIN2-positive LDs, and consistently accumulated all species of TAGs. Furthermore, in absence of spastin the conversion of exogenous radio-labelled oleic acid into TAGs was enhanced, indicating an increased biogenesis of LDs. The LD phenotype of spastin KO cells was rescued by re-expressing wild-type spastin, but not by mutants lacking the MT-binding domain or carrying a mutation in the ATPase domain, indicating that loss of spastin-mediated MT severing is responsible for the LD phenotype in the KO cells. An increase in the number and size of LDs upon starvation was also confirmed in mouse embryonic fibroblasts obtained from a spastin-deficient mouse model. In these KO fibroblasts, sites of LD biogenesis at the ER were increased. Furthermore, loss of spastin led to the formation of many small but clustered or few large LDs. Many large LDs failed to redistribute towards the cell periphery upon glucose starvation, a phenomenon that has been shown to be dependent on stable detyrosinated MTs. Finally, I performed time-lapse confocal live imaging experiments to assess whether MT severing and LD growth and dislocation from the ER are coupled events. Remarkably, I found that MT severing often occurred prior to the movement of an emerging LD from the ER in WT cells, while it was observed with significantly reduced frequency in KO cells. These findings reveal the involvement of spastin-mediated MT remodelling at the ER-LD interface in the emergence of LDs from the ER and in regulating LD biogenesis and dispersion during energy deprivation. Since mutations in spastin are implicated in hereditary spastic paraplegia, a disease characterized by degeneration of corticospinal axons, these data open the question of the role of LD biogenesis in the pathogenesis of the disease.

### **Zusammenfassung**

Lipidtröpfchen (LT) sind intrazelluläre Organellen, die neutrale Lipide wie Triacylglycerine (TAG) und Sterolester in einer Phospholipid-Monoschicht speichern. LT werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und können nach der Reifung entweder mit dem ER verbunden bleiben oder ins Zytoplasma abgekoppelt werden. LT reagieren auf metabolische Herausforderungen, indem sie neutrale Lipide ansammeln oder mobilisieren. Es ist bisher nur wenig bekannt, wie dieser Prozess reguliert wird. In Säugetierzellen verlaufen die Tubuli des ERs parallel zu Mikrotubuli (MT) und sowohl die ER- als auch die LT-Dynamik ist von MT abhängig. Die Dynamik von MT kann durch Schneide-Enzyme, die an jeder beliebigen Stelle verteilt über die gesamte Länge schneiden können, kontrolliert werden. Wir haben bereits gezeigt, dass eine Isoform des MT-Schneideproteins Spastin, welches auch das ER bindet, vom ER zu den LT re-lokalisieren kann. Die N-terminale Region von Spastin war für das Targeting zu LT verantwortlich. Die mechanistischen Ursachen für dieses Targeting und die Rolle Spastins in der LT-Biologie blieben bisher im Dunkeln. Zu diesem Zweck habe ich immortalisierte motorneuronen-artige Spastin Knock-out (KO) Zellen erzeugt. Ich fand heraus, dass Spastin-KO-Zellen, insbesondere nach Nährstoffentzug, mehr PLIN2-positive LT enthielten und alle Arten von TAG akkumulierten. Darüber hinaus ist in Abwesenheit von Spastin die Umwandlung von exogener radioaktiv-markierter Ölsäure in TAG vermehrt, was auf eine erhöhte Biogenese von LT hinweist. Der LT-Phänotyp der Spastin-KO-Zellen wurde durch die Re-Expression von Wildtyp-Spastin vermindert, nicht aber durch Mutanten, denen die MT-Bindedomäne fehlt oder die eine Mutation in der ATPase-Domäne tragen. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust des spastin-vermittelten MT-Separierens für den LT-Phänotyp in den KO-Zellen verantwortlich ist. Eine Zunahme der Anzahl und Größe von LT nach Nährstoffentzug wurde auch bei embryonalen Maus-Fibroblasten, die aus einem spastin-defizienten Mausmodell gewonnen wurden, bestätigt. In diesen KO-Fibroblasten erhöhte sich die Anzahl an Entstehungsorten der LT im ER. Des Weiteren führte der Verlust von Spastin zur Bildung vieler kleiner aber aggregierter oder weniger großer LT. Bei Glukosemangel re-lokalisierten viele große LT nicht in Richtung Zellperipherie, ein Phänomen, das nachweislich von stabilen, detyrosinierten MT abhängt. Schließlich führte ich konfokale time-lapse Live-Imaging-Experimente durch, um zu überprüfen, ob das Separieren der MT und das Wachstum und die Dislokation von LT aus dem ER gekoppelte Ereignisse sind. Bemerkenswert ist, dass das MT-Separieren vermehrt vor der Bewegung eines aus dem ER austretenden LT in WT-Zellen auftrat, während es bei KO-Zellen mit deutlich reduzierter Frequenz beobachtet wurde.

## ***Zusammenfassung***

---

Diese Ergebnisse zeigen die Beteiligung der spastin-vermittelten Veränderung der MT an der ER-LT-Schnittstelle an der Entstehung von LT aus dem ER und an der Regulierung der LT-Biogenese und -Verteilung während eines Nährstoffentzugs. Da Mutationen von Spastin an der hereditären spastischen Paraplegie beteiligt sind, einer Krankheit, die durch die Degeneration von kortikospinalen Axonen gekennzeichnet ist, werfen diese Daten die Frage nach der Rolle der LT-Biogenese in der Pathogenese der Krankheit auf.